

寒 天 に 就 て (續 報)

寒天の化學、物理的性質の研究及び寒天の品質の差異が微生物の生育に及ぼす影響に就て

農學博士

辻 板 野 新 犬
康 彦

(日本農藝化學會誌 第十卷第九册百二十號 昭和九年九月發表)

緒 言

寒天の品質は產地、原藻及び處理法等に依り其化學的成分及び物理的諸性質に可なりの差異を生ずるものと思はれる。従つて寒天を使用するに當つては其目的に依り先づ之等の諸性質を吟味する事が必要である。殊に微生物の培養に用ふる際は培養基の化學的成分並に物理的性質の差異が生育と密接なる關係を持つものであるが故に特に品質に對して考慮する必要があると考へられる。

近來寒天の科學及び工業上の需要の増加に伴ひ斯の如き基礎的研究も刺戟せられ、品質の判定にも從來の外觀的検査法に依らずして、物理化學的試驗法が採用せられんとする形勢に向ひつゝある。著者等も既に寒天に關する一般的報告、

品質と沃素含量等に就て報告したのであるが本稿に於ては同じ試料に就て品質と二、三の化學的成分、物理的性質並びに微生物の生育に及ぼす影響に就て研究を試みたる結果を報告するものである。

實驗の部

試料

兵庫縣産の寒天の市販品一等品、二等品及び三等品の三種を用ひ粉碎機にて細粉として試験に供した。

第一部 寒天（乾燥）に關する測定

一、水分

試料二gを採り攝氏一〇五度乃至一一〇度に乾燥し測定せり。

		水分%
1	一等品	29.37
2	二等品	29.24
3	三等品	28.20

二、全窒素

試料五——一〇gをケールダール法にて分析せる結果は次の如くである。

三、全 灰 分

試料3gを坩堝中に灼熱灰化して測定す。

	風乾物 1g 中 窒素 (mg)	乾物 1g 中 窒素 (mg)
1 號 品	0.571	0.406
2 號 品	0.841	1.064
3 號 品	1.892	2.303

	風乾物 1g 中 灰分 (g)	乾物 1g 中 灰分 (g)
1 號 品	0.0282	0.0354
2 號 品	0.0308	0.0401
3 號 品	0.0437	0.0688

四、凝固速度測定

一定量の試料に蒸溜水一〇〇c.c.を加へ一時間時々振盪し乍ら放置したる後逆流冷却器を附し煮沸して充分溶解せしむ溶液の尙熱き内に口徑2cmの同様な試験管に一〇c.c.宛を注入し攝氏四五度の定溫槽中に二〇分間冷却したる後攝氏三〇度の定溫槽中に入れ各時間に取り出し凝固狀態を測定せり。

溶液の狀態より凝固に至る程度をA・B・C・Dの四種に分ち且其階程に於ける強弱を表す爲に(+)、(-)を附して其凝固狀態を示せば次の如くである。

寒天 1.5g に蒸留水 100c.c. を加へた場合

時間(分)	1.5	2	2.5	3	3.5
寒天の種類					
1 等 品	A	B	C	C (+)	D
2 等 品	A	B	C	C (+)	D
3 等 品	A	A	B	C	D (-)

寒天 0.7g に蒸留水 100c.c. を加へた場合

時間(分)	3	4	5	6	7
寒天の種類					
1 等 品	B	C	C (+)	D	D
2 等 品	B	C	C	C (+)	D
3 等 品	A	B	C	C	D (-)

寒天 0.5g に蒸留水 100c.c. を加へた場合

時間(分)	5	7	9	11	13
寒天の種類					
1 等 品	A	C	C	C (+)	D
2 等 品	A	C	C	C (+)	D
3 等 品	A	B	C (-)	C (-)	C (+)

寒天 0.3g に蒸溜水 100c.c. を加へた場合

時間(分)		20	30	40	50	60
寒天の種類	1 等品	B	C	C	C	C
	2 等品	B(-)	C(-)	C	C	C
	3 等品	A	B	C(-)	C(-)	C(-)

寒天 0.1g に蒸溜水 100c.c. を加へた場合

時間(分)		30	70	70	90	120
寒天の種類	1 等品	A	A	A	A	A
	2 等品	A	A	A	A	A
	3 等品	A	A	A	A	A

五、溶解速度測定

試料〇、五gに蒸溜水一〇〇c.c.を加へ時々振盪し乍ら一時間放置したる後逆流冷却器を附して攝氏九〇度の湯煎鍋中に浸け一様に振盪して各時間毎に其溶解状態を測定せる結果次の如くである。

寒天に就て (續報)

寒天の品別	時間							
	5	10	15	20	25	30	35	40
1 品	+	+	+	++	++	++	++	++
2 品	+	+	+	+	+	++	++	++
3 品	+	+	+	+	+	++	++	++

(一) はたけに溶解せしめるもの、(+) はたけに溶解せしめるもの。

以上五試験の結果より見るに水分に於て一等品が少く、全窒素、全灰分は二、三等品になるに従ひ増加し、三等品に於ては一等品に比較し全窒素約五倍、全灰分に於て約二倍量を示してゐる。凝固速度は一等品、二等品共に大體同様な傾向を示すも三等品は遅く、〇、三%以下の濃度にてはいづれも完全な凝固を示さない。溶解速度は一等品最も早く二等品、三等品の順序であるが三等品に於ても三〇分にて完全に液解する。

第二部 寒天溶液に關する測定

寒天の〇、一%溶液に就て以下の實驗を行つた。

一、比 重

寒天〇、一%に蒸溜水一〇〇c.c.を加へ時々振盪し乍ら一時間浸漬したる後逆流冷却器を附して一〇分間煮沸溶解せしめ室温に放冷したる後測定す。

1 品	1.00113
2 品	1.00014

1.00019

二、比電導度

上記同様に處理溶解せしめたるものに就て攝氏三〇度に於て比電導度を測定す。

1	g	3.536 $\times 10^{-3}$ (mho)
2	g	3.823 $\times 10^{-3}$ ("
3	g	4.234 $\times 10^{-3}$ ("

三、滲透壓測定

上記同様に處理せる溶液に就て氷點降下度を測定し其れより滲透壓を算出すれば次の如くなる。

1	g	0.1815 (mmHg)
2	g	0.4235 ("
3	g	0.4719 ("

四、比粘度

上記同様に處理し乾燥濾紙にて濾過して不溶解物を除きたるものに就て四五°Cの定溫槽中にてオストワルド粘度計により測定す。

1	g	1.367
2	g	1.571
3	g	1.524

五、表面張力

寒天に就て (續前)

上記同様に處理し攝氏四五度に於て du Noüy 氏の方法に依り測定せし結果次の如し。

1	個	品	73.0 (dynes/sq. cm)
2	個	品	73.2 (")
3	個	品	70.5 (")

六、水素イオン濃度

上記同様に處理したる〇、一%溶液を室温に放冷したる後キンヒドラン電極法により其水素イオン濃度を測定す。

		pH
1	品	5.08
2	品	6.13
3	品	6.22

以上の結果より見るに比重、比電導度、滲透壓は一、二、三等品の順序に漸次大なる價を示し比粘度及び表面張力に於ては其逆に漸次減少を示してゐる。之等の差異は寒天膠質自身の性質並に之に混入して來る有機及び無機物の綜合的影響を示すものであるが故に此の結果より直ちに各々其原因を推測する事は困難であるが比電導度及び滲透壓の増加は不純物就中電解質の増加を示すものと思はれる。水素イオン濃度は一等品最も高く二等品及び三等品は大體同様であつて、 $\text{pH } 6-6.4$ の少しく酸性側の價を示してゐる。

第三部 寒天滲出液に關する測定

寒天中に混在する不純物中物理的性質に影響するものは大部分水に可溶性のものと考えられ且つ寒天溶液に於ては高

い濃度を用ひる際は凝固する爲め測定が不可能である。此の點よりして比較的多量の試料を用ひ（普通の固體培養基に用ひる約二倍量）其冷水浸出液に就て溶液に於けると同様な試験を行ひ不純物の影響を測定した。

一、比 重

寒天一〇gに蒸溜水三〇〇c.c.を加へ振盪機にかけて二時間振盪したる後乾燥せる濾紙にて濾過し比重を測定した。

海ニキ	1	試 品	1.000152
	2	試 品	1.000291
	3	試 品	1.000134

二、比電導度

上記と同様に處理せる濾液に就て攝氏三〇度に於て比電導度を測定した。

海ニキ	1	試 品	1.401×10^{-4}
	2	試 品	2.287×10^{-4}
	3	試 品	2.225×10^{-4}

三、滲 透 壓

上記と同様に處理せる濾液に就て氷點降下度を測定し之より滲透壓を算出した。

海ニキ	1	試 品	0.7687 (mmHg)
	2	試 品	0.7776 (〃)
	3	試 品	0.8170 (〃)

四、比 粘 度

上記同様に處理せる濾液に就て攝氏三〇度の定溫槽中にオストワルドの粘度計により測定す。

1	管	品	1.140
2	管	品	1.308
3	管	品	1.402

五、表 面 張 力

上記同様に處理せる濾液に就て室溫に於て du Noüy 氏の方法により測定せる結果次の如し。

1	管	品	70.4 (dynes/sq. cm)
2	管	品	65.2 (")
3	管	品	63.7 (")

六、水素イオン濃度

試料一に對して蒸溜水を二〇の割合に加へ一時間時々振盪し乍ら放置したる後乾燥濾紙にて濾過しキンヒドラン電極法により測定す。

		pH
1	管品	6.52
2	管品	6.86
3	管品	6.81

次に寒天一に對し蒸溜水を二〇の割合に加へ時々振盪し乍ら一時間放置したる後懸濁液に就てキンヒドラン電極法に

依り測定す。

	pH
1 糖品	6.67
2 糖品	6.88
3 糖品	6.70

以上の結果より比重、比電導度、滲透壓及び比粘度は共に一、二及び三等品の順序に價の増大を示してゐるが表面張力に於ては一等品が最も大きく二及び三等品は大體同様である。此の結果を溶液の場合と比較すれば比粘度を除く外は何れも同様な傾向を示し二時間冷水に浸漬し抽出したる成分に於ても（大部分不純物と考へられるのであるが）可なり顯著に差異を認める事が出来る。比粘度が溶液の場合と逆の傾向を示すのは膠質の性質の差異による影響が大なるものと考へられる。水素イオン濃度は滲出濾液に就ても亦懸濁液に就て行へる場合に於ても殆んど一致せる結果を得、一等品最も高く二、三等品の順序に減少を示してゐる。此の傾向は溶液に就て測定せる場合と同様であるが其價は溶液の方が p^H として約〇、七低く出てゐる。

第四部 細菌に對する影響に就て

第一部、第二部及び第三部の實驗結果より見るに寒天は其品質に依つて化學的成分に於ても亦物理的性質に於ても可なりの差異のある事を認める事が出来る。

寒天は現在微生物の固體培養基としては最も多量に用ひられ従つて微生物の研究には缺く事の出来ぬ重要性を有してゐる。細菌を培養する場合に於て其生育並に形態等が培養基の化學成分はもとより其物理的性質と密接な關係のある事

は既に幾多の研究によつて明白である。従つて上述の如く成分及び性質に相違のある寒天を固體培養基に用いた際には細菌に對して何等かの影響を及ぼすものと考へられる。此の際培養基の濃度、種類及び菌の種類によつて其程度に差異のあるべきは當然思考し得る事である。

未だ此の種の影響に關する研究報告は著者等は聞知しない故に枯草菌、空中窒素固定菌及び酵母に就て研究を試みた。使用せる寒天は其影響を明瞭にする爲め一等品及び三等品の二種を用ひ菌は何れも當研究室の種菌を使用した。

一、枯草菌に對する影響

使用せる培養基の成分を示せば次の如くである。

アルブミン寒天 (Albumin Agar)

葡 萄 糖	1.0g	肉汁ペプトン寒天 (Nutrient Agar)	
鹽基性磷酸加里	0.5g	ベプトン	5.0g
硫 酸 苦 土	0.2g	肉汁エキス(ルービツヒ氏)	3.0g
硫酸酸化鐵	數滴	蒸 溜 水	1000c.c.
卵白アルブミン	0.25g	寒 天	15g
蒸 溜 水	1000c.c.		
寒 天	15g		

枯草菌の生育の差異

以上の培養基に寒天の一等品及び三等品を用ひ約攝氏四五度にて溶解せるもの一五c.c.宛を口径八cmのペトリ皿に注入す。之に豫め各培養液にて稀釋した純粹培養菌を殺菌ビベットにて一定量宛接種し攝氏三〇度の定溫器中に同様な條件

の下に培養した。之を毎日取出し肉眼で識別し得る聚落の数を計算し同時に聚落の大なるものより順に一〇個を取り其最長徑を測り平均値を求め、之等二つに依つて生育の程度を表した。

アルブミン寒天に就て行へる結果を示せば次の如くである。

田 敷	寒天の種類	1 等		3 等	
		聚 落 の 数	聚 落 の 大 さ I/20cm	聚 落 の 数	聚 落 の 大 さ I/20cm
2	田 田	51.0	0.34	73.0	0.62
3	田 田	77.0	1.26	73.0	1.72
4	田 田	74.0	1.74	73.0	2.10
5	田 田	—	1.66	—	2.25
6	田 田	—	2.10	—	2.46
7	田 田	—	2.30	—	2.74

肉汁ペプトン寒天に於ける結果を示せば次の如くである。

田 敷	寒天の種類	1 等		3 等	
		聚 落 の 数	聚 落 の 大 さ I/20cm	聚 落 の 数	聚 落 の 大 さ I/20cm
2	田 田	77.7	2.45	76.5	3.32
3	田 田	76.2	3.10	77.5	4.62
4	田 田	73.7	3.52	74.5	5.07

アムモニヤ生成量の差異

上記生育の差異を測定せると同様に一等品並に三等品を使用せる培養基を約攝氏四五度に溶解して同様な條件に於て殺菌せるビベットに依つて正確に一〇c.c.を徑八cmのペトリ皿中に注入す。之に豫め各培養液にて稀釋せる純粹培養菌の一定量を殺菌ビベットにて接種し攝氏三〇度の定溫器中に培養す。一〇日後之を取出し培養器をペトリ皿より剝離し少量の硫酸を加へて酸性に保つて溶解しプレエゲルのミクロケールダールのアムモニヤ蒸溜装置によりアムモニヤを蒸溜しネツスラーの試藥に依つて比色定量せり。

アルブミン寒天培養基に就て測定せる結果次の如し。

培養基 100c.c. 中の全アムモニヤ量 (Nとしてmg)		培養基 100c.c. 中のアムモニヤ生成量 (Nとしてmg)	
1	品	1.550	1.426
3	品	1.037	1.587

肉汁ペプトン寒天培養基に就て測定せる結果を示せば次の如くである。

培養基 100c.c. 中の全アムモニヤ量 (Nとしてmg)		培養基 100c.c. 中のアムモニヤ生成量 (Nとしてmg)	
1	品	12.505	9.845
3	品	14.196	11.046

二、空中窒素固定菌 (*Azotobacter chroococcum*) に対する影響

使用せる培養基の成分を示せば次の如くである。

アッシュビー氏 (Ashby) 培養基			
マシナイト	10~15g	硫酸	0.1g
炭酸石灰	0.2g	炭酸石灰	5.0g
鹽化曹達	0.2g	炭酸水	1000c.c.
酸性磷酸加里	0.2g	寒天	15.0g

アゾトバクターの生育の差異

枯草菌に於けると同様にアシュビー氏培養基に就て測定せる結果を示せば次の如くである。

日 数	寒天の種類	第一等		第三等	
		聚落の數	聚落の大きさ (1/20cm)	聚落の數	聚落の大きさ (1/20cm)
2	目	—	—	36	—
3	目	170.8	0.00	175.0	1.73
4	目	183.8	2.02	185.3	2.57
5	目	191.3	2.58	187.5	3.16
6	目	—	3.47	—	4.05
7	目	—	3.67	—	4.62

空中窒素固定量の差異

寒天に就て (讀取)

上記生育の差異を測定せると同様なる培養基を約攝氏四五度に溶解し正確に殺菌ビベットに依つて一〇c.c.を徑八cmのペトリ皿に注入し前同様一定量の菌を接種して攝氏三〇度の定溫器中に培養す。一〇日後之を取出し培養基を剝離し少量の硫酸を加へて酸性に保つて溶解せしめ五〇c.c.に滿す。此の内一〇—二〇c.c.を取りプレエーゲルのミクロケールダール法に依り窒素の分解並に蒸溜を行ひネッスラー試薬を用ひて比色定量せり。

	培養基 100/c.c. 中の全窒素 (mg)	培養基 100/c.c. 中の窒素固定量 (mg)
1 等 品	13.008	11.348
2 等 品	17.455	14.230

三、酵母に對する影響

使用せる培養基の成分を示せば次の如くである。

ラクレント氏の (Lamont) 培養基		麵 水 培 養 基	
硫酸アムモニヤ	4.71 g	麵	1000 c.c.
硫 酸 苣 土	0.10 g	寒	15.00 g
酸性磷酸加里	0.75 g		
麥 芽 糖	50.00 g		
蒸 溜 水	1000 c.c.		
寒	15.00 g		

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の生育の差異

枯草菌及びアゾトバクターの場合と全く同様に上記二種の培養基の一五c.c.に一定量の菌を接種しベトリ皿にて攝氏三〇度の定溫器中に培養す。毎日之を取出して聚落の數並に大きさを測定せり。

ラウレント氏の培養基に就て行へる結果を示せば次の如くである。

日 數	寒天の種類	一 等		二 等	
		聚 落 の 數	聚 落 の 大 小 (1/20cm)	聚 落 の 數	聚 落 の 大 小 (1/20cm)
2 日	田	—	—	23.3	—
3 日	田	13.3	0.41	178.8	1.14
4 日	田	177.0	0.83	185.5	1.79
5 日	田	177.2	1.22	183.5	2.31
6 日	田	—	1.98	—	2.43
7 日	田	—	1.62	—	2.76

麴水培養基に就て同様に行つた結果を示せば次の如くである。

日 數	寒天の種類	一 等		二 等	
		聚 落 の 數	聚 落 の 大 小 (1/20cm)	聚 落 の 數	聚 落 の 大 小 (1/20cm)
2 日	田	221.0	2.23	225.7	2.26
3 日	田	222.5	6.64	223.5	7.15
4 日	田	221.0	8.32	223.0	9.70

糖分消費量の差異

上記生育を測定せると全く同様に培養基を約攝氏四五度に溶解し正確に殺菌ビベットにて一〇c.を取り一定量の酵母を接種しペトリ皿にて攝氏三〇度の定溫器中に培養す。一〇日後培養基をペトリ皿より剝離し加溫溶解し一定量に稀釋したる後糖類微量定量法 (荒川左千代、糖類の微量定量法に就て。鳥取農學會報、第一卷 285~290) に依り糖分殘量を測定せり。

ラウレント氏培養基に就て行へる結果を示せば次の如くである。

	培養基 100c.c. 中の糖分*殘量 (g)	培養基 100c.c. 中の糖分*消費量 (g)
1 等 品	16.414	14.087
3 等 品	12.888	13.687

* 糖分は Maltose として算出す。

海水培養基に就て行へる結果は次の如くである。

	培養基 100c.c. 中の糖分*殘量 (g)	培養基 100c.c. 中の糖分*消費量 (g)
1 等 品	13.246	40.919
3 等 品	11.411	43.148

* 糖分は Maltose として算出す。

以上の結果より枯草菌、空中窒素固定菌及び酵母は何れも三等品を用いたる培養基に於て發育が良好である。今各測定の最初と最後に於ける聚落の大きさを半径の二乗で表し三等品の一等品に對する比率を算出すれば次の如くである。

聚落の大きさの比率 $\left(\frac{3\text{等品}}{1\text{等品}}\right)$

枯 草 菌

日 数	フルグミン寒天培養基	日 数	肉汁ペプトン寒天培養基
2 7	3.325 1.419	2 4	1.836 2.036

空中窒素固定菌

日 数	アシュビー氏培養基
2 7	3.050 1.384

母 群

日 数	ラクレント氏培養基	日 数	鹽 水 培 養 基
2	3.403	2	1.385
7	2.902	4	1.359

此の結果より見るに大體培養の初期に於て其差異が最も著しく最後に於ては比較的接近した値を示して居る。但し肉汁ペプトン寒天培養基及び麴水培養基に於ては以上の傾向が認められない。之は此の二種の培養基に於ては枯草菌及び酵母の生育が極めて良好であり従つて寒天の品質に依つて影響される所が少ないものと考へられる。

次にアムモニヤ生成量、空中窒素固定量及び糖分消費量に就て一等品培養基に對する三等品の比率を求むれば次の如くである。

比 率 $\left(\frac{3 \text{ 等品}}{1 \text{ 等品}}\right)$

枯草菌のアムモニヤ生成量 (10日間培養)	
アルブミン寒天培養基	1.112
肉汁ペプトン寒天培養基	1.121
アソトバクターの空中窒素固定量 (10 日間培養)	
アシュビー氏培養基	1.273
酵母の糖分消費量	
ラクレント氏培養基	1.326
麴水寒天培養基	1.054

大體聚落の大きと同様な傾向が認められ酵母のラウレント氏培養基に於ける差異が最も著しく三等品培養基に於て約三二%の糖分消費量の増加を示し、生育の良好な肉汁ペプトン寒天培養基及び麴水寒天培養基に於ては其差が最も少ない。アルブミン寒天培養基に於ける差異の僅少なるは其生育が悪くアムモニヤ生成量が極めて少量なるに依るものと考へらる。

以上の結果より寒天の品質が培養基及菌の種類に依り細菌の生育に對し可なり著しい影響を及ぼす事を認める事が出来る。

總 括

一、寒天の品質と其成分並に性質との差異を明かにせんとし一等品二等品及び三等品に就て水分、全窒素、灰分、凝固速度及び溶解速度を測定し次いで寒天の〇、一%溶液並に滲出液に就て比重、比電導度、滲透壓、比粘度、表面張力及び水素イオン濃度を測定せり。

(a) 寒天の品質良好なるに従ひ全窒素及び灰分は少く凝固速度並に溶解速度は大である

(b) 寒天溶液及び滲出液に於て比重、比電導度、滲透壓及び表面張力は共に品質の良好なるに従ひ小なる値を示し水素イオン濃度は一等品稍高く一般に溶液は浸出液に比し濃度が大である。

二、寒天の成分並に性質の差異が細菌に及ぼす影響を明らかにせんとし一等品及び三等品を用ひて固體培養基を作り之に枯草菌、空中窒素固定菌及び酵母を接種し兩者に於ける生育の差異を測定せり。

枯草菌、空中窒素固定菌及び酵母共に強弱の程度の差は存在するも常に三等品を用いた培養基に於ける生育が良好であつて、酵母のラウレント氏培養基に於ては約三二%の差異を示した。

三、以上の結果に依つて寒天は品質により成分、性質並に細菌に對する影響等に可なりの差異の有る事を認める事が出来る。此の試験に用ひた試料は同一製造業者より購入せるものであるが尙他の産地、原藻及び製造法等に依つては更に著しい差異のあるべき事も想像し得られる。従つて寒天の使用に當つては先其目的に依り品質に就て相當考慮すべき必要があるものと思考せられる。

文 獻

- (1) A. Itano : Reports on General Survey and Investigation on Agar. Berichte d. Ohara Inst. f. landw. Forschungen. VI : 70~72, 1933.
- (2) Ibid : Investigation on Agar as to its Iodine Content. Proc. Imperial Academy (Japan) IX : 398~401, 1933.
- (3) 板野新夫, 辻康彦 : 寒天中の沃素に就て, 農學研究, 第22卷, 頁 168~193, 1934.